

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

D3



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 31 741 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
A 61 K 49/00
C 07 K 14/435
C 07 K 14/765
G 01 N 33/15
G 01 N 33/52
G 01 N 33/68

②1 Aktenzeichen: 197 31 741.3
②2 Anmeldetag: 23. 7. 97
④3 Offenlegungstag: 28. 1. 99

DE 197 31 741 A 1

⑦1 Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:

Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦2 Erfinder:

Sinn, Hannsjörg, Dipl.-Chem. Dr., 69168 Wiesloch,
DE; Wunder, Andreas, Dipl.-Biol., 69214 Eppelheim,
DE; Schrenk, Hans-Hermann, 67378 Zeiskam, DE;
Stehle, G., Dr., 69123 Heidelberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Konjugat zur Unterscheidung von krankhaftem und gesundem Gewebe

⑤7 Die Erfindung betrifft Konjugate, umfassend eine zur
Fluoreszenz-fähige Verbindung und einen Träger, wobei
die Verbindung und der Träger über eine Säureester- oder
Säureamid-Bindung verbunden sind und die Verbindung
eine Anregungswellenlänge von 630 nm oder größer und/
oder 450 nm oder kleiner aufweist. Ferner betrifft die Er-
findung die Herstellung solcher Konjugate sowie ihre Ver-
wendung.

*Fluoreszenzfähige Verbindung ist
an den Träger über eine
Ester- oder Säureamidbindung
gebunden*

DE 197 31 741 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Konjugate zur Unterscheidung von krankhaftem und gesundem Gewebe, Verfahren zur Herstellung solcher Konjugate sowie ihre Verwendung.

In der Behandlung von krankhaftem Gewebe, z. B. von Tumoren, ist die Entfernung desselben oft ein essentieller Schritt. Hierzu ist es notwendig, daß der operierende Arzt genau erkennt, wo krankhaftes Gewebe endet und gesundes Gewebe beginnt. Dies ist allerdings oft nicht möglich. Ausläufer des krankhaften Gewebes werden daher übersehen, die dann die Basis für die erneute Entstehung des krankhaften Gewebes darstellt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem krankhaftes von gesundem Gewebe unterschieden werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, umfassend eine zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und einen Träger, wobei die Verbindung und der Träger über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung oder Enan-Brücke (Schiffsche Base) verbunden sind und die Verbindung eine Anregungswellenlänge von 630 nm oder größer und/oder 450 nm oder kleiner aufweist.

Der Ausdruck "Träger" umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die zur Anreicherung des Konjugats in einem bestimmten Gewebe, z. B. einem Tumor, einem Entzündungsherd oder in oberflächlich gelegenen kleineren Gefäßen, wie Neovaskularisationen im Bereich der Cornea (Hornhaut des Auges), geeignet sind. Beispiele solcher Träger sind Proteine und Polyether. Zur Ausbildung der Säureester- oder Säureamidbindung mit der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung kann der Träger Hydroxyl- oder Amino-Gruppen aufweisen.

Die Proteine werden vorzugsweise nicht als körperfremd angesehen. Sie können in nativer Form vorliegen. In der nativen Form weisen die Proteine kein inter- und/oder intramolekulares Cross-Linking auf. Günstigerweise besitzen die Proteine ein Molekulargewicht von bis zu 100 000 Dalton, insbesondere 30 000 bis 100 000 Dalton. Ferner ist es günstig, wenn die Proteine humane Proteine sind. Beispiele der Proteine sind Albumin, Fibrinogen, Transferrin, Immunglobuline und Lipoproteine, wobei humanes Serumalbumin (HSA) bevorzugt ist. Es können auch Fragmente vorstehender Proteine verwendet werden. Ferner kann die Sequenz der Proteine bzw. der Fragmente davon Änderungen von einer oder mehreren Aminosäuren gegenüber bekannten Sequenzen der Proteine bzw. Fragmente davon aufweisen.

Beispiele der Polyether sind Polyethylenglykole, insbesondere solche mit einem Molekulargewicht von 100 bis 20 000 Dalton. Vorzugsweise sind die Polyethylenglykole an der endständigen Hydroxylgruppe mit einer C₁-C₁₂-Alkylgruppe, insbesondere mit einer Methylgruppe, verestert oder verethert.

Ein erfindungsgemäßes Konjugat kann einen oder mehrere, insbesondere 2 bis 4, vorstehender Träger aufweisen. Liegen mehrere Träger vor, so können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Liegen mehrere Polyether vor, so werden diese günstigerweise so gewählt, daß das Molekulargewicht aller Polyether ca. 20 000 Dalton oder mehr beträgt.

Der Ausdruck "zur Fluoreszenz-fähige Verbindung" umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die zur Fluoreszenz angeregt werden können. Diese Verbindungen können auch photoaktiv sein. Die Verbindung ist über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung oder Enan-Brücke an den Träger gebunden. Zur Ausbildung dieser kann die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung eine Säuregruppe, z. B. eine Carbon-, Sul-

fon-, Phosphon- oder Arson-Säuregruppe, eine Hydroxylgruppe, eine Aminogruppe oder eine Aldehydgruppe aufweisen. Es können mehrere dieser Gruppen vorliegen, die gleich oder verschieden voneinander sein können. Die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung wird bei einer Wellenlänge von 630 nm oder größer, bevorzugt 630 bis 850 nm und besonders bevorzugt 650 bis 850 nm und/oder bei einer Wellenlänge von 450 nm oder kleiner, bevorzugt 320 bis 450 nm angeregt. Diese Wellenlängen beziehen sich auf Anregungswellenlängen, die die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung im erfindungsgemäßen Konjugat aufweist; in freier Form kann ihre Anregungswellenlänge davon abweichen. Vertreter dieser Verbindungen sind Porphyrine, wie Tetrasulfophenylporphyrin (TSPP; Anregungswellenlänge 650 nm, wenn es an HSA gebunden ist), Chlorine, Bakteriochlorine, Chlorophylle, Phtalocyanine, wobei diese Verbindungen Metallionen als Zentralatom aufweisen können. Ferner sind Vertreter der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung Carboxyzimtsäure, Carboxyfluorescein, Acridincarbonsäure, wie Acridin-9-carbonsäure, Cumarinsäure, wie Cumarin 343, Cumarin-3-carbonsäure und Hydroxycumarinsäure (Anregungswellenlänge 365 nm, wenn es an HSA gebunden ist), und Indocyaningrün (Anregungswellenlänge 805 nm, wenn es an HSA gebunden ist), sowie Derivate vorstehender Verbindungen.

Von der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung können im erfindungsgemäßen Konjugat eine oder mehrere vorhanden sein. Liegen mehrere vor, dann können sie gleich oder verschieden voneinander sein.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Konjugate sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

Erfindungsgemäße Konjugate können hergestellt werden, indem die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung mit dem Träger unter Ausbildung einer Säureester- oder Säureamid-Bindung kovalent verbunden wird. Hierzu geeignete Verfahren sowie benötigte Materialien sind dem Fachmann bekannt.

Wenn die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung eine Säuregruppe aufweist, dann können die Konjugate hergestellt werden, indem diese Verbindung mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid zu reaktiven Succinimidylestern und diese dann mit dem Träger umgesetzt werden. Bei Konjugaten mit mehreren zur Fluoreszenz-fähigen Verbindungen kann die Herstellung der Succinimidylester gemeinsam oder getrennt erfolgen.

Die Umsetzung der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid erfolgt in einem polaren aprotischen Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Das Mol-Verhältnis von zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung:Carbodiimid:Hydroxysuccinimid beträgt etwa 1 : 1,5-3 : 5-10. Der gebildete Succinimidylester wird dann in einer wäßrigen Pufferlösung, vorzugsweise NaHCO₃, mit dem Träger, wie Albumin, umgesetzt. Die Trägerkonzentration beträgt etwa 10 bis 70 mg/ml. Die so aktivierte Säuregruppe kann dann unter Ausbildung von Säureamid- oder Säureester-Bindungen mit OH- und NH-Gruppen des Trägers reagieren, wobei erfindungsgemäße Konjugate erhalten werden. Die Konjugate können mehrfach gereinigt werden, z. B. durch Ultrafiltration, und schließlich steril filtriert werden, worauf sie applikationsfertig sind.

Erfindungsgemäße Konjugate zeichnen sich durch eine erhöhte Halbwertszeit im Organismus aus. Desweiteren reichern sich erfindungsgemäße Konjugate in krankhaftem Gewebe, insbesondere in Tumorgewebe, in Entzündungsherden und in oberflächlich gelegenen kleineren Gefäßen, z. B. von Neovaskularisationen im Bereich der Cornea an. Durch Licht wird die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung angeregt, wodurch krankhaftes Gewebe sichtbar gemacht werden

kann, wohingegen gesundes Gewebe, in dem sich die erfindungsgemäßen Konjugate nicht anreichern, nicht sichtbar gemacht wird. Ferner erfolgt keine Störung durch die Eigenfluoreszenz des Blutes oder von Gewebe, z. B. der Leber, wodurch der optische Eindruck nicht verfälscht wird. Weiterhin weisen erfindungsgemäße Konjugate, in der die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung bei 630 nm oder größer angeregt werden kann, eine hohe Eindringtiefe auf.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die Herstellung eines Konjugates aus Acridin-9-carbonsäure und humanem Serumalbumin.

Fig. 2 zeigt die Herstellung eines Konjugates aus Cumarin 343 und humanem Serumalbumin und

Fig. 3 zeigt die Herstellung eines Konjugates aus Tetra-sulfophenylporphin und humanem Serumalbumin.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus Acridin-9-carbonsäure und humanem Serumalbumin

Die Struktur und die Herstellung des Konjugats sind in **Fig. 1** dargestellt.

Es wurden 20 mg Acridin-9-carbonsäurehydrat (A9CS) in 2 ml DMSO gelöst und etwa 100 mg N-Hydroxysuccinimid (HSI) im Molverhältnis von etwa 10/1 sowie 30 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) im Molverhältnis von etwa 1,5/1 zugegeben. Nach etwa 6 Stunden ist die Bildung des Hydroxysuccinimidylesters abgeschlossen. Nach dem Abtrennen des Dicyclohexylharnstoffs (DCHH) über einen lösungsmittelbeständigen Filter (0,2 µm) wird der Ester zu einer Lösung von 2 g humanem Serumalbumin (HSA), das in 10 ml Originallösung, 10 ml 0,34 M NaHCO₃ und 10 ml Methoxypolyethylenglykol (MPEG) gelöst ist, langsam zugegeben. Die bei der Zugabe entstehende leichte Trübung löst sich nach kurzer Zeit wieder auf. Es entsteht eine leicht gelbliche Lösung eines Konjugats aus A9CS und HSA. Die Abtrennung der im fertigen Präparat unerwünschten Begleitstoffe, wie überschüssiges DCC, HSI, nicht gebundenes A9CS, DMSO und MPEG, erfolgt durch Ultrafiltration (Ausschlußgrenze 10 kD) mit mindestens 4 Waschvorgängen.

Beispiel 2

Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus Cumarin 343 und humanem Serumalbumin

Die Struktur und die Herstellung des Konjugates sind in **Fig. 2** dargestellt.

In 2 ml DMSO wurden 20 mg Cumarin 343 (C343 = 10-Carboxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-[1]benzopyranon[6,7,8,ij]chinolizin-11-on) gelöst. Dazu wurden etwa 100 mg HSI im Molverhältnis von 10/1 und 30 mg DCC im Molverhältnis von etwa 1,5/1 zugegeben. Der Ester wurde wie in Beispiel 1 beschrieben isoliert und mit HSA umgesetzt, wobei eine intensiv gelbe Lösung eines Konjugates aus C343 und HSA erhalten wurde. Die Abtrennung von unerwünschten Begleitstoffen erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 3

Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus Tetra-(4-sulfophenyl)-porphin und humanem Serumalbumin

Die Struktur des Konjugates und dessen Herstellung sind in **Fig. 3** dargestellt.

Tetra-(4-sulfophenyl)-porphin (TSPP) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO gelöst. Zu der klaren dunkelgrünen Lösung wurde die dreifache molare Menge an DCC und die fünffache molare Menge an HSI zugegeben. Nach etwa 3 bis 4 Stunden Reaktionszeit ist die Umsetzung zum TSPP-Succinimidylester (TSPP-SE) beendet, wobei der gebildete Di-Cyclohexylharnstoff feinkörnig abgeschieden wird. Die analytische Kontrolle erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie.

Humanes Serumalbumin (HSA, 4 g, d. h. 2 Ampullen zu je 2 g in 10 ml) wurden mit 2 × 10 ml 0,17 M NaHCO₃ und 20 ml Methoxypolyethylenglykol₃₅₀ verdünnt und in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben vorgelegt. Zu dieser HSA-Lösung wurde langsam unter ständigem Rühren vorstehende TSPP-SE-Lösung in DMSO zugefügt, wobei sich die zunächst klare Lösung durch nicht umgesetztes DCC, das in wäßriger Lösung unlöslich ist, eintrübt. Nach Beendigung der Zugabe von TSPP-SE wurde das Reaktionsgemisch zur vollständigen Umsetzung 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Trübung über eine Sterilfiltereinheit (Millipore, Stericup – GV, 0,22 µm Low Binding Duropore Membrane) und die niedermolekularen wasserlöslichen Komponenten (DMSO, HSI und nicht gebundenes TSPP) durch Ultrafiltration über eine Membran mit 30 kD Ausschlußgrenze (Amicon YM 30) abgetrennt. Es wurde ein erfindungsgemäßes Konjugat aus TSPP und HSA erhalten. Die Kopplungsausbeute von TSPP an HSA betrug 85 bis 90%.

Die analytische Reinheitskontrolle erfolgte mittels HPLC unter folgenden Bedingungen:

Vorsäule: Zorbax Diol (50 × 4 mm)

Säule 1: Zorbax GF 450

Säule 2: Zorbax GF 450

Laufmittel: 0,2 M Na-citrat, pH 7,5

Fluß: 1 ml/min

Detektor 1: 280 nm (für das Protein)

Detektor 2: 420 nm (für TSPP)

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend eine zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und einen Träger, wobei die Verbindung und der Träger über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung eine Enan-Brücke verbunden sind und die Verbindung in dem Konjugat eine Anregungswellenlänge von 630 nm oder größer und/oder 450 nm oder kleiner aufweist.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Protein ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein ein nicht als körpertremd angesehenes, natives Protein ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein humanes Serumalbumin ist.
5. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Polyether ist.
6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyether ein Polyethylenglykol ist.
7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Träger vorliegen.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, da-

durch gekennzeichnet, daß die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung eine Säuregruppe, Hydroxylgruppe, Aminogruppe oder Aldehydgruppe aufweist.

9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungswellenlänge 5 630 bis 850 nm beträgt.

10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungswellenlänge 320 bis 450 nm beträgt.

11. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung abgeleitet ist von Porphyrin, Chlorin, Bakteriochlorin, Chlorophyll, Phtalocyanin, Carboxyzimsäure, Carboxyfluorescein, Acridinsäure, Cumarinsäure oder Indocyaningrün sowie den Derivaten davon. 15

12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere zur Fluoreszenz-fähige Verbindungen vorliegen.

13. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, 20 daß die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und der Träger unter Ausbildung einer Säureester oder Säureamid-Bindung kovalent verbunden werden.

14. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Unterscheidung von krankhaftem 25 und gesundem Gewebe.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

30

35

40

45

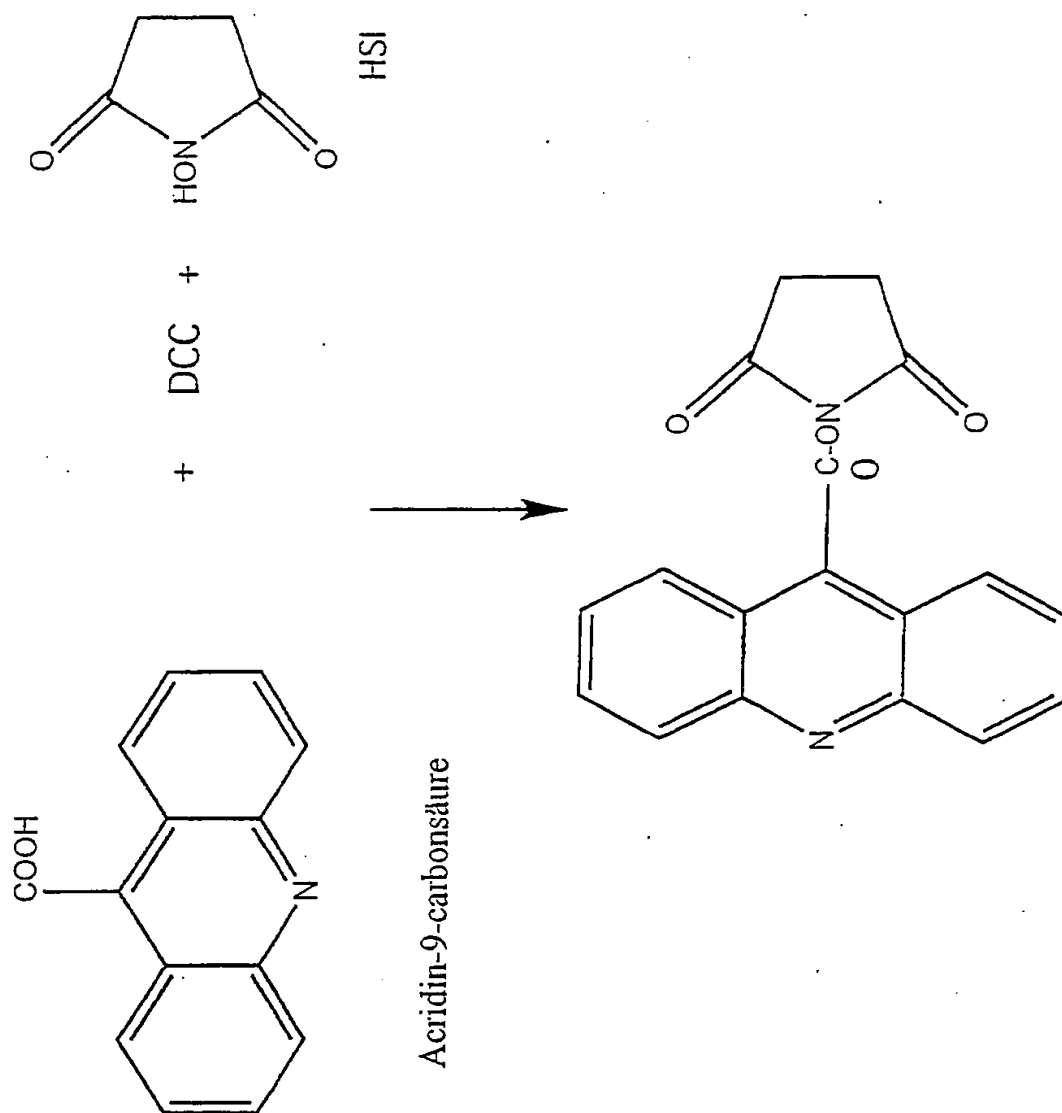
50

55

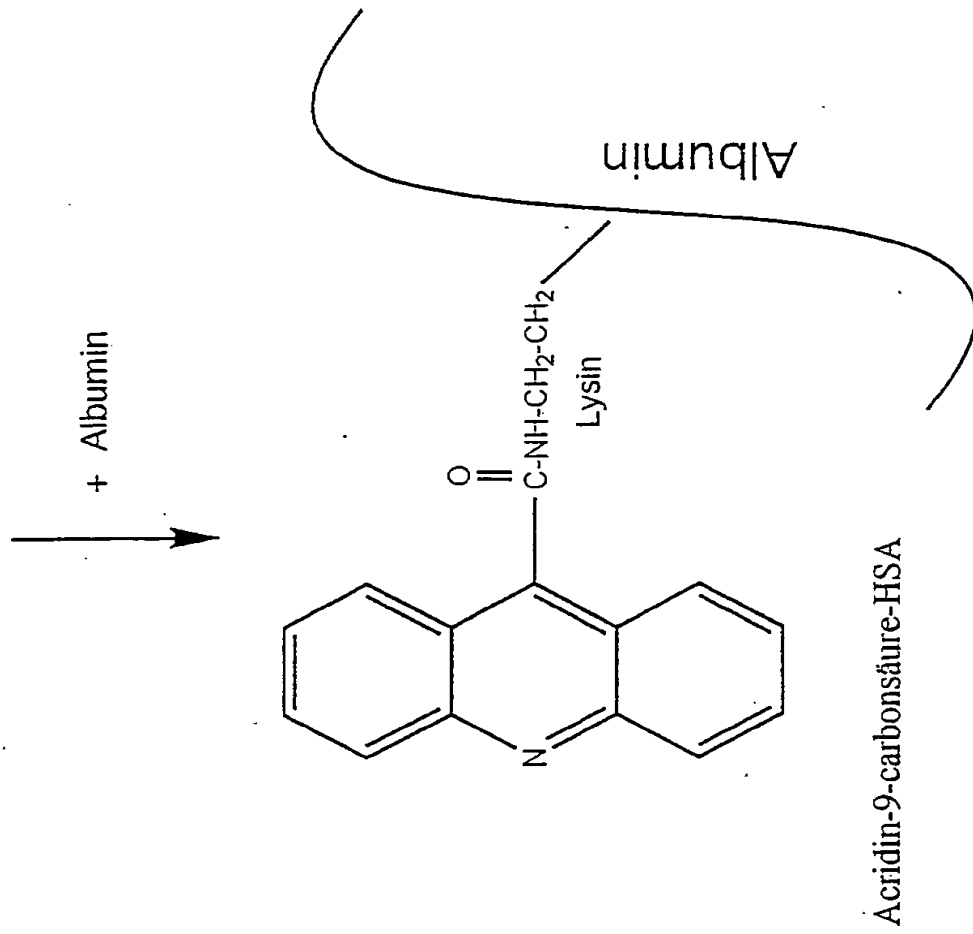
60

65

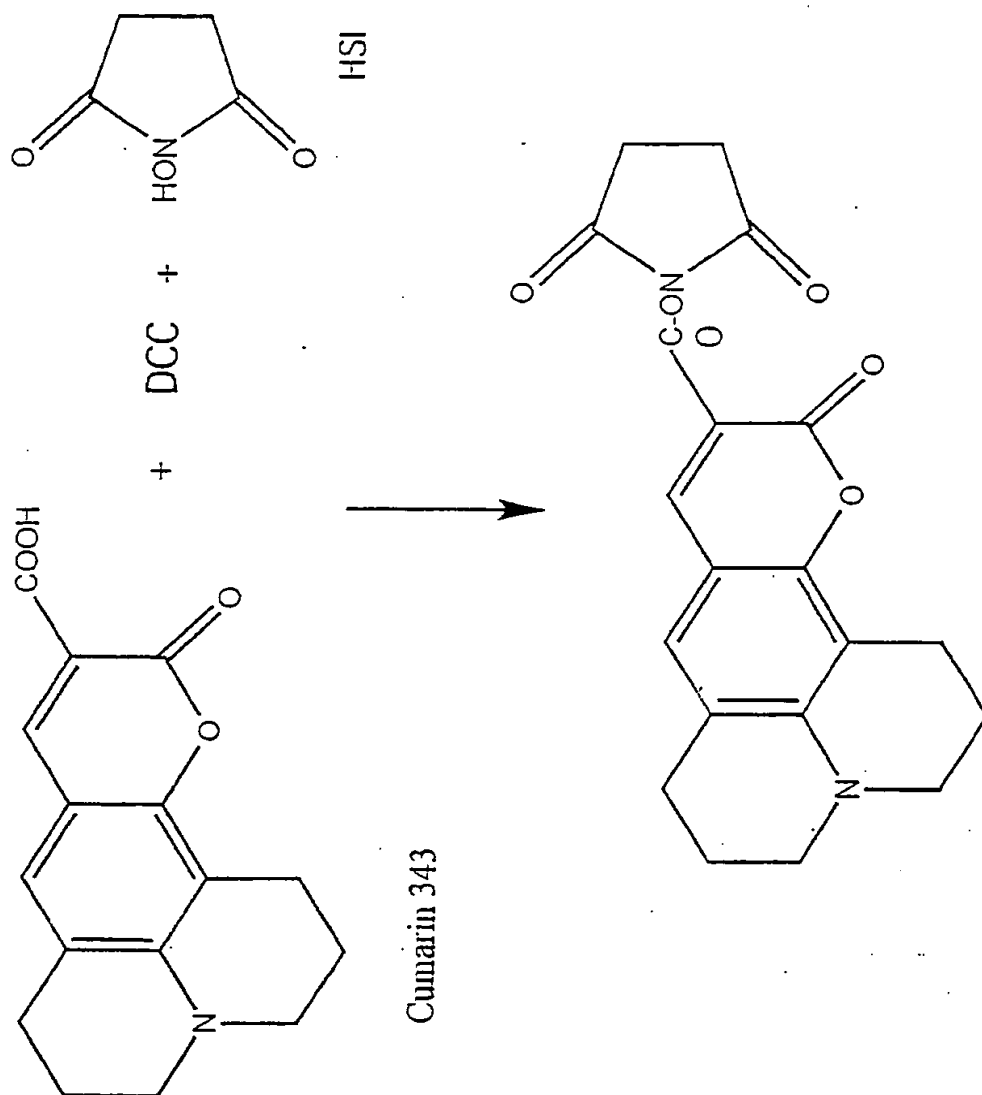
Figur 1:



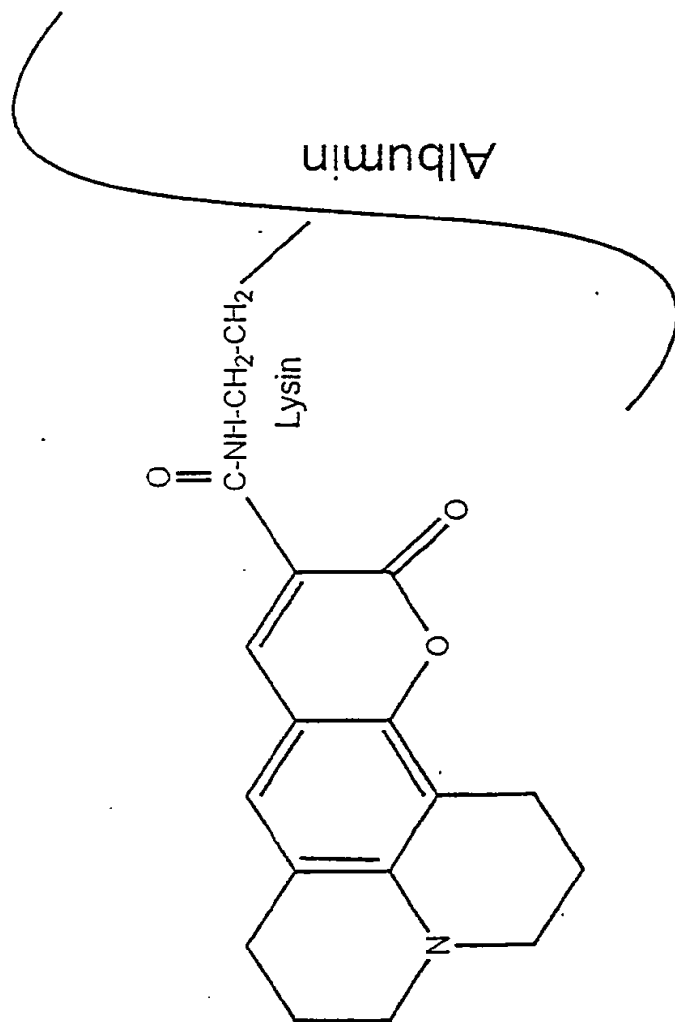
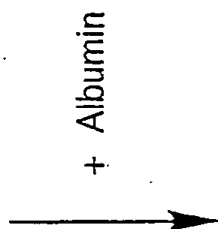
Figur 1 (Fortsetzung)



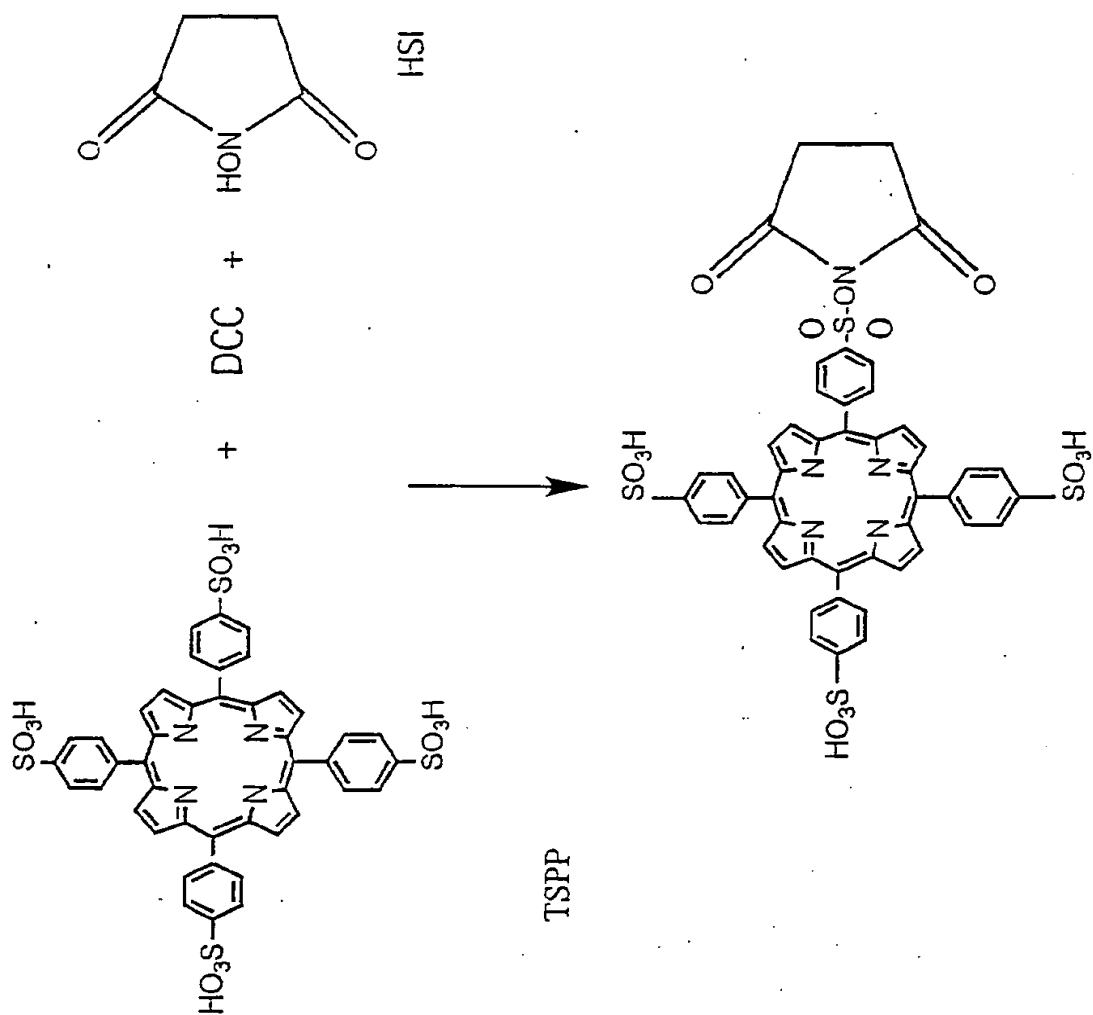
Figur 2:



Figur 2 (Fortsetzung)



Figur 3:



Figur 3 (Fortsetzung)

